

C-Peptide ELISA Kit

Code K6220

An enzyme immunoassay for the quantitative measurement of C-peptide in human clinical samples. This kit contains reagents for 96 test wells.

Un test enzymatique pour une mesure quantitative du peptide-C sur des échantillons humains. La trousse contient des réactifs pour 96 puits de test.

Enzymimmunttest zur quantitativen Bestimmung von C-Peptide In Humanen Proben. Dieser Kit enthält Reagenzien für 96 Vertiefungen.

1 INTENDED USE

Dako C-peptide ELISA Kit is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative measurement of C-peptide in human serum and plasma.

2 SUMMARY

C-peptide is formed as a by-product of the processing of insulin in the pancreatic β cell. Proinsulin is cleaved proteolytically to form equimolar amounts of mature insulin and C-peptide which are released into the portal circulation. So called because it connects the A and B chains of insulin in the proinsulin molecule, C-peptide is a single chain of 31 amino acids (mol wt 3020 D) and, unlike insulin, has no known physiological function. Because C-peptide has a longer half-life than insulin (2-5 times longer) higher concentrations of C-peptide persist in the peripheral circulation, and these levels fluctuate less than insulin. For these reasons, plasma C-peptide concentrations may reflect pancreatic insulin secretion more reliably than the level of insulin itself.¹

C-peptide measurement is used for the following clinical applications:-¹

1. To assess the residual β cell function in patients treated with insulin and to distinguish between type 1 diabetes and type 2 diabetes. Of particular interest is its use to indicate the need for progression to insulin therapy in type 2 diabetes.
2. The diagnosis of factitious hypoglycaemia. The surreptitious administration of insulin causes high insulin levels in the absence of elevated C-peptide concentrations.
3. Insulinoma diagnosis, especially in patients treated with insulin. C-peptide measurement is used in insulin suppression tests in euglycaemic patients with suspected insulinoma. Elevated C-peptide levels in this test are indicative of insulinoma.
4. As a marker for residual pancreatic tissue after pancreatectomy. In the case of insulinoma, C-peptide measurement may be used to detect metastasis and the response to therapy. It may also be used to monitor the progress of pancreas or islet cell transplantation.

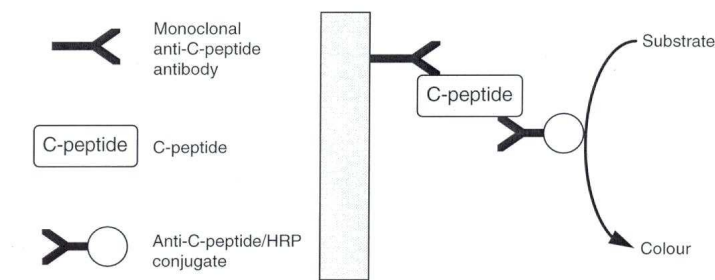
Until recently routine C-peptide measurement has only been possible by radioimmunoassay, although HPLC methods have been described in the literature.² Dako C-peptide is an enzyme immunoassay for the quantitative determination of C-peptide.

3 PRINCIPLE OF THE TEST

Dako C-peptide is an ELISA based on two monoclonal antibodies. Simultaneous incubation of specimen and enzyme-labelled antibody in a microplate microwell coated with a specific anti-C-peptide antibody forms a complex. A simple washing step removes unbound enzyme-labelled antibody. The bound conjugate is detected by reaction with the substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). The reaction is stopped by adding acid to give a colorimetric endpoint that is read spectrophotometrically.

The inclusion of calibrators of known C-peptide concentration in the assay allows a calibration curve to be constructed from which the level of C-peptide in samples can be determined. The assay principle is shown below in Figure 1.

Figure 1: Dako C-peptide assay principle



4 DEFINITIONS

Explanation of symbols:

REF	Product code and catalogue number
	Consult the instructions for use
	Contains sufficient for 'N' tests
	Manufacturer
IVD	In vitro diagnostic medical device
	Use by
LOT	Batch code
	Storage temperature limitations
	Add water

5 REAGENTS PROVIDED

96 - Each kit contains sufficient materials for 96 determinations. - The shelf life of the kit is as indicated on the outer box label.

5.1 DAKO C-PEPTIDE TEST CONTENTS

One Instructions for Use Booklet.

MICROTITRATION PLATE One x 96 microwell plate of 12, 8 microwell strips coated with mouse monoclonal anti-C-peptide antibody. A resealable plastic pouch is provided for storage of unused microwells.

One bottle of each of the following:

CALIBRATOR 1 5 mL Calibrator 1: Protein matrix with an anti-microbial agent.

CALIBRATOR 2 Calibrators 2 - 5 (lyophilised): Synthetic C-peptide in a protein

(109467-003)

K6220/EFG/CKJ/2009.06.17 p. 3/43

CALIBRATOR 3
CALIBRATOR 4
CALIBRATOR 5

matrix with an anti-microbial agent. The assay is calibrated against International Reference Reagent IRR 84/510, and values are expressed in both ng/mL and in S.I. units (pmol/L) (calculated from the molecular weight of C-peptide, 3020 D). Precise values in both units are stated on the Value sheet included with the product and must always be used for calibration of the assay. The approximate values are:-

Calibrator	1	2	3	4	5
ng/mL	0	0.3	3	9	15
pmol/L	0	100	1000	3000	5000

CONJUGATE CONCENTRATE

2.5 mL Conjugate Concentrate: Anti-C-peptide monoclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) in an organic buffered solution containing protein, inorganic salts, a red coloured dye and an anti-microbial agent.

CONJUGATE DILUENT

10 mL Conjugate Diluent: Organic buffered solution containing inorganic salts, protein and an anti-microbial agent.

WASH BUFFER (15x)

28 mL Wash Buffer Concentrate (15x): Organic buffered solution containing detergent, inorganic salts and an anti-microbial agent.

SUBSTRATE TMB

13 mL Substrate: stabilised peroxide and 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate in a dilute buffer solution. TMB has been reported to be non-carcinogenic. However, personal protective equipment is recommended to avoid direct exposure.

STOP SOLUTION

13 mL Stop Solution: 0.46 mol/L sulphuric acid.

5.2 RECONSTITUTION, STORAGE AND RE-USE OF KIT COMPONENTS

Dako C-peptide allows for testing of up to 86 batches of specimens during any 8 week period. In order to ensure optimal kit performance, it is important that all reconstituted and unused kit components are stored according to the following instructions.

5.2.1 Monoclonal Antibody Coated Microwells - MICROTITRATION PLATE

Open the plate pouch by cutting along the seal. Break off the required number of microwell strips and relocate them into the frame. **Use only complete strips.** Place unused microwells in the resealable plastic pouch with the dessicant, carefully reseal the pouch and store at 2-8 °C. Microwells may be used for up to 8 weeks after initial opening, provided they are stored in this manner.

5.2.2 Calibrator 1 - CALIBRATOR 1

Ready to use. Store unused Calibrator 1 at 2-8 °C. Calibrator 1 may be used for up to 8 weeks at 2-8 °C after initial opening, provided it is stored in this manner.

5.2.3 Calibrators 2 - 5 - CALIBRATOR 2CALIBRATOR 3CALIBRATOR 4CALIBRATOR 5

Reconstitute the lyophilised calibrators with 1 mL of fresh distilled or deionised water. Discard the stoppers after reconstitution. Allow to stand for 10-15 minutes at room temperature, mix gently before use. Aliquot and store reconstituted calibrators upright at 2-8 °C for up to 5 days or -20 °C for up to 8 weeks .

5.2.4 Conjugate Concentrate and Conjugate Diluent – CONJUGATE CONCENTRATECONJUGATE DILUENT

Dilute the conjugate concentrate (2.5 mL) by adding the conjugate diluent (10 mL). This is sufficient for 96 microwells. Mix gently before use. Store working strength Conjugate at 2-8 °C for up to 8 weeks.

5.2.5 Wash Buffer Concentrate - WASH BUFFER (15x)

Provided 15x concentrate. Prepare working strength wash buffer by adding 1 part of wash buffer to 14 parts of fresh deionised or distilled water. For 96 microwells dilute 28 mL of wash buffer concentrate with 392 mL of deionised or distilled water to give a total volume of 420 mL.

Prepare working strength wash buffer as required on the day of use. Store unused concentrate at 2-8 °C.

Do not store unused working strength wash buffer for subsequent use (see Section 8.2.11).

5.2.6 Substrate Solution - SUBSTRATE TMB

Ready to use. Store unused substrate at 2-8°C, protect from light.

5.2.7 Stop Solution - STOP SOLUTION

Ready to use. Store unused reagent at 2-8 °C.

6 ADDITIONAL REAGENTS

6.1 REAGENTS

Fresh deionised or distilled water for reconstitution of Calibrators 2-5 and preparation of working strength wash buffer.

6.2 ACCESSORIES

The following products are intended for use in conjunction with Dako C-peptide. Contact your local Dako subsidiary or distributor for further information.

The Diabetes Immunoassay Control Set (Code S6247) is intended as a tri-level control for use with diabetes immunoassays.

7 EQUIPMENT

The following equipment is required:

Precision pipettes and disposable tips or adjustable multichannel pipettes tips to deliver 25 µL -250 µL.

V-shaped reagent troughs.

Timer.

Clean absorbent paper (on to which microwells can be tapped dry).

Measuring cylinder 500 mL.

Microtitration plate shaker. For information on suitability of plate shakers contact your local Dako subsidiary or distributor.

Automated plate washer (optional) or suitable equipment for washing 8 microwell strips (Section 10.2.4).

Spectrophotometer or EIA plate reader able to read a 96 microwell plate of 8 microwell strips at an absorbance of 450 nm with a reference at 620-650 nm. (Optional, Section 10.3, Reading the Test Results).

Application notes for use on open automated systems are available for this assay. Contact your local Dako subsidiary or distributor.

8 PRECAUTIONS

 - For in vitro diagnostic use. For professional use only.

8.1 SAFETY PRECAUTIONS

- 8.1.1** The stop solution is sulphuric acid (0.46 mol/L). Avoid eye and skin contact by wearing protective clothing and eye protection.
- 8.1.2** Clinical specimens may contain infectious agents eg Hepatitis B virus and HIV. All specimens, calibrators, controls and materials that come into contact with them, should be treated as potentially infectious and handled accordingly.
- 8.1.3** Ensure that cuts, abrasions and skin lesions are properly protected and take precautions to avoid self inoculation or splashing of mucous membranes.
- 8.1.4** As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
- 8.1.5** Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
- 8.1.6** Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
- 8.1.7** Safety data sheet available for professional user on request.

8.2 TECHNICAL PRECAUTIONS

- 8.2.1** Components must not be used after the expiry date printed on the labels. Do not mix different lots of reagents.
- 8.2.2** Test performance will be adversely affected if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in Section 5.2.
- 8.2.3** Avoid contamination of reagents.
- 8.2.4** Every effort should be made to ensure that no cross-contamination occurs between wells. It is essential that enzyme-conjugated monoclonal antibody is not allowed to contaminate reagents and equipment. A separate pipette should be reserved for dispensing the conjugate and care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well. Conjugate allowed to dry on to the rim of the well may adversely affect the performance of the test.
- 8.2.5** All equipment including washers and liquid handling devices must be free of microbial contamination and be correctly calibrated and maintained according to the manufacturer's instructions.
- 8.2.6** Do not store unused working strength wash buffer for subsequent use. When not in use wash buffer reservoirs should be rinsed in deionised or distilled water and left to dry.
- 8.2.7** Microwells cannot be re-used.
- 8.2.8** Do not use substrate showing a blue colour prior to its addition to the microwells.
- 8.2.9** Protect substrate from light.
- 8.2.10** It is recommended that samples are run in duplicate until the laboratory is totally familiar with the assay.
- 8.2.11** Test results should be interpreted in conjunction with information available from epidemiological studies, clinical assessment of the patient and other diagnostic procedures.

9 COLLECTION AND PREPARATION OF SPECIMENS

Dako C-peptide has been designed for use with human serum and plasma.

9.1 SERUM

Collect blood by venepuncture into tubes without additives, allow to clot and separate the serum from cells by centrifugation. Store samples for up to 3 days at 2-8 °C or for up to 28 days at – 20°C. Aliquot, if necessary, to avoid repeated freezing and thawing of samples, and do not thaw frozen samples by heating above ambient temperature.

9.2 PLASMA

Collect blood by venepuncture into tubes containing heparin or EDTA as anticoagulant. Centrifuge, separate the plasma fraction and store for up to 3 days at 2-8 °C or for up to 28 days at –20 °C. Aliquot, if necessary, to avoid repeated freezing and thawing of samples, and do not thaw frozen samples by heating above ambient temperature.

10 TEST PROCEDURE

PLEASE REFER TO SECTION 8.2 TECHNICAL PRECAUTIONS BEFORE PERFORMING TEST PROCEDURE.

10.1 GENERAL NOTES

10.1.1 Ensure that, within any run, all the reaction times are the same by adding reagents in the same timed sequence.

10.1.2 Pipette into the reagent trough only as much liquid as necessary for any assay.

Do not return excess reagents to bottles after use.

10.2 ASSAY PROCEDURE

NOTE: The assay procedure requires the use of a microtitration plate shaker. For information on suitability of shakers contact your local Dako subsidiary or distributor.

10.2.1 Calibrator, Specimen and Control Addition

Locate the required number of microtitration strips into the microwell holder, according to the number of determinations required. Pipette 25 µL of calibrator, specimen or control into the microwells. Duplicate microwells should be used for the calibrators. **The position of each patient sample on the microtitration plate must be recorded.**

10.2.2 Conjugate Addition

After addition of all calibrators, specimens or controls, add 100 µL of conjugate into each microwell. Avoid cross contamination between microwells.

10.2.3 First Incubation

Place the microtitration plate on the plate shaker and shake during the incubation at 20-30 °C for 60 minutes.

10.2.4 Washing the Microwells

The microwells should be washed using working strength wash buffer (Section 5.2.5).

The washing technique is critical to the test performance and should be carried out so as to ensure complete filling (with a minimum of **250 µL** of working strength wash buffer) and emptying of the microwells.

Three wash cycles are essential, by either automated or manual washing techniques.

Manual washing

If washing microwells manually, aspirate or shake out the contents of the microwells and using freshly prepared wash buffer, ensure complete filling and emptying of microwells. Between each wash step remove all remaining wash buffer by tapping the inverted microwells on to clean absorbent paper. Repeat the process twice, rotating the plate after each wash to start in the opposite direction (a total of 3 washes). Manual washing efficiency is further ensured if the wash buffer is delivered at an angle so as to produce a vortex in the microwells. After the final wash, the plate should be inverted and tapped on absorbent paper to remove the last traces of wash buffer.

Automated washing

Automated washers should be programmed to complete 3 wash cycles. Soak steps are not required. Washers must be correctly calibrated to ensure complete filling and emptying of microwells between each wash. After the final wash, the plate should be inverted and tapped on absorbent paper to remove the last traces of wash buffer.

10.2.5 Substrate Addition and Second Incubation

Add 100 µL substrate solution to each microwell. Place the microtitration plate on the plate shaker and shake for 10 minutes at 20-30 °C.

Note: If using a plate reader with a maximum absorbance of 2.2 AU, reduce the substrate incubation time to 7 minutes.

10.2.6 Stop the Reaction

Add 100 µL stop solution to each microwell, allowing the same time interval between each strip as in Section 10.2.5. Ensure thorough mixing in the microwells.

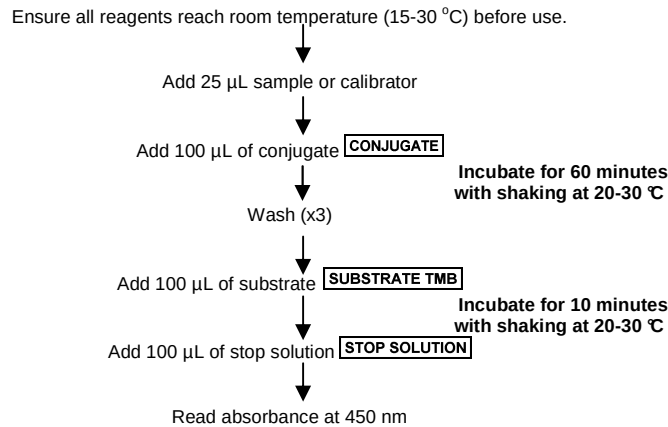
10.3 READING THE TEST RESULTS

10.3.1 PHOTOMETRIC READING

The plate must be read photometrically within 30 minutes after addition of the stop solution. **Protect the plate from light until ready to read.** Mix the contents of the microwells and read the absorbance of each microwell using a suitable spectrophotometer or EIA plate reader set at 450 nm. Ensure that the bottoms of the microwells are clean before reading and check that no foreign matter is present in the microwells. The reader should be blanked on air (ie with no plate in the carriage) before the plate is scanned.

Alternatively if the spectrophotometer or EIA plate reader allows for the use of a reference wavelength (at 620 to 650 nm), dual wavelength reading should be performed which will eliminate any potential interference caused by aberrations, such as dirt or marks, on the optical surface of the microwells.

10.4 SUMMARY OF DAKO C-PEPTIDE ASSAY PROCEDURE



11 CALCULATION AND RESULTS

Patient sample results are estimated from a calibration curve constructed either manually or automatically by computer.

11.1 AUTOMATED CALCULATION

Refer to the plate reader manual. Plot the absorbance obtained against the concentration of C-peptide in the calibrators. A four parameter curve fit is recommended to construct the calibration curve from which patient sample results are estimated.

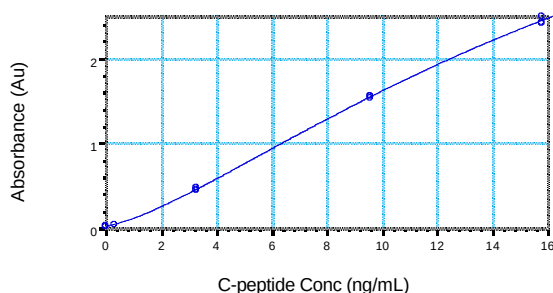
Owing to the nature of the four parameter fit, it may be necessary to enter the value of the calibrator 1 as 0.001. This will ensure that the curve passes through all data points. For further details please contact your local Dako subsidiary or distributor.

11.2 MANUAL CALCULATION

Results can be calculated manually using graph paper. Plot C-peptide concentration on a linear scale on the x axis and the absorbance on a linear scale on the y axis. Construct the calibration curve and use this to determine the concentration of C-peptide in patient samples.

11.3 TYPICAL CALIBRATION CURVE

Figure 1: A typical C-peptide calibration curve (ng/mL)



Note: This graph is for the purpose of illustration only and should not be used to determine results.

11.4 DILUTION OF SAMPLES OF HIGH CONCENTRATION

Samples with concentrations of C-peptide expected to be in excess of the top calibrator should be diluted 1 in 4 (v/v) with Calibrator 1 before performing the assay.

12 PERFORMANCE LIMITATIONS

12.1 INTERFERENCES

Clinical evaluations indicate that samples containing high concentrations of lipid or bilirubin do not interfere in the C-peptide assay.

No interference from rheumatoid factor or heterophilic antibodies was seen.

12.2 HAEMOLYSIS

Grossly haemolysed samples should not be used as lower assay values may be obtained.

12.3 "HIGH DOSE HOOK EFFECT"

In two site immunoassay systems the response curve may invert in the presence of extremely high analyte concentrations. In the C-peptide assay this effect occurs at greater than 120 ng/mL (40,000 pmol/L) C-peptide.

12.4 SERUM AND PLASMA

Both serum and plasma can be used. During clinical evaluation, no clinically significant difference was found in measured C-peptide between matched serum and plasma samples. Both heparin and EDTA anticoagulants may be used.

12.5 PROINSULIN AND PROINSULIN COMPLEXES

Even though circulating C-peptide is in 50 times molar excess compared to proinsulin, samples with elevated proinsulin levels will produce increased values in C-peptide (Section 14.2.3).

The presence of circulating proinsulin/anti-insulin antibody complexes in some patients may also interfere with the assay. In such cases it is suggested that the C-peptide levels are measured after precipitation with polyethylene glycol (PEG)³.

12.6 RENAL INSUFFICIENCY

Because the kidney is the major site for C-peptide metabolism, patients with severe renal insufficiency may have abnormally high circulating C-peptide levels.

12.7 FORENSIC APPLICATIONS

The C-peptide assay is not intended for forensic use and has not been validated with post mortem samples.

13 EXPECTED VALUES

It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals.

Reference intervals can differ considerably between methods. Do not use reference intervals established for other methods.

14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The data presented in this section was obtained during independent clinical evaluations and/or at Dako.

14.1 PRECISION

14.1.1 Within (intra) assay precision

Three pools of patient samples covering the range of the assay were tested 24 times on a single plate.

Pool	n	Mean	SD (ng/mL)	Mean	SD (pmol/L)	CV (%)
1	24	1.55	0.04	513	13.3	2.6
2	24	3.6	0.12	1190	39.3	3.3
3	24	6.2	0.24	2050	80.0	3.9

14.1.2 Between (inter) assay precision

Three pools of patient samples covering the range of assay were tested in 10 assays.

Pool	n	Mean	SD (ng/mL)	Mean	SD (pmol/L)	CV (%)
1	10	1.77	0.08	586	26.4	4.5
2	10	3.4	0.05	1130	17.0	1.5
3	10	5.1	0.17	1690	55.8	3.3

14.1.3 Detection Limit (Sensitivity)

The limit of detection was assessed in 2 assays by testing 20 replicates of the zero calibrator. The average value obtained corresponds to a signal 2.5 standard deviations from the mean signal of the calibrator 1.

Detection limit: 0.09 ng/mL (30 pmol/L)

14.2 ACCURACY

14.2.1 Linearity

Three patient samples (heparin plasma) with high analyte concentrations were diluted with calibrator 1.

Sample	Dilution Factor	Result (ng/mL)	Observed/Expected (%)
1	Neat	7.6	
	1:2	3.8	100
	1:4	2.0	105
2	Neat	8.0	
	1:2	4.1	103
	1:4	2.1	105
3	Neat	8.1	
	1:2	4.1	101
	1:4	2.1	104

14.2.2 Recovery

Three plasma sample pools with low analyte concentrations were spiked with different concentrations of C-peptide and the recovery calculated as a percentage.

Added C-peptide (ng/mL)	Result (ng/mL)	Recovery (%)
Sample pool 1	2.4	
Sample pool 1 + 1.9	4.3	100
Sample pool 1 + 4.3	6.7	100
Sample pool 1 + 7.8	9.7	94
Sample pool 2	1.9	
Sample pool 2 + 1.9	3.6	90
Sample pool 2 + 4.3	5.9	93
Sample pool 2 + 7.8	9.5	97
Sample pool 3	1.5	
Sample pool 3 + 1.9	3.5	105
Sample pool 3 + 4.3	6.0	105
Sample pool 3 + 7.8	9.3	100

14.2.3 Cross reactivity

The specificity of the assay was assessed by observing cross reaction with structurally related peptides and hormones.

Cross reactivity (%) was calculated from the mass of C-peptide and the mass of cross reactant giving the same assay signal.

Analysis	Cross reactivity (%)
Intact human proinsulin (biosynthetic)	84
32-33 split proinsulin	83
Human insulin	0*

* Insulin at a concentration of 240,000 pmol/L was below the detection limit of the C-peptide assay.

Fasting concentrations of intact and split proinsulins are typically only 1-2% of C-peptide concentrations. Cross-reactivity with these molecules, therefore, is not clinically significant.

1 INTERET MEDICAL

Le kit Dako C-Peptide ELISA Kit est un test immunoenzymatique ELISA pour le dosage du peptide-C dans le sérum et le plasma humains.

2 RESUME

Le peptide-C apparaît au cours de la synthèse de l'insuline dans les cellules β des îlots de Langerhans. La proinsuline, précurseur, se transforme en peptide-C et en insuline, sécrétés en quantité équimolaire dans la circulation sanguine. Dans la molécule de proinsuline, le peptide-C connecte les chaînes A et B de l'insuline. Il est lui-même constitué d'une chaîne de 31 acides aminés (poids moléculaire de 3020 D) et contrairement à l'insuline, ne possède pas de fonction physiologique connue. Du fait de sa longue demi-vie, (2-5 fois supérieure à celle de l'insuline), la concentration du peptide-C est plus importante que celle de l'insuline dans la circulation périphérique et son taux fluctue moins. Les concentrations en peptide-C dans le plasma permettent d'évaluer la sécrétion en insuline par le pancréas de façon plus fiable que le niveau en insuline lui-même (1).

Les dosages de peptide-C ont été utilisés dans les contextes cliniques suivants (1):

1. Evaluation de la fonction résiduelle des cellules β du pancréas chez les patients traités à l'insuline et outil de différenciation entre le diabète de type 1 et le diabète de type 2. Ces dosages s'avèrent particulièrement utiles pour déterminer s'il convient de passer à une insulino-thérapie en cas de diabète de type 2.
2. Diagnostic de l'hypoglycémie artificielle. En cas de surdosage d'insuline, on note un haut niveau en insuline mais pas en peptide-C.
3. Diagnostic de l'insulinome, notamment chez les patients traités à l'insuline. Les dosages de peptide-C sont utilisés dans le cadre des tests de freinage de la sécrétion d'insuline chez les patients euglycémiques en cas de suspicion d'insulinome. Des niveaux élevés de peptide-C révélés par ce test indiquent un insulinome.
4. Marqueur de tissu résiduel pancréatique après une pancréatectomie. Dans le cas d'insulinome, les mesures en peptide-C permettent de détecter des métastases et d'évaluer les réponses à une thérapie. Ces mesures peuvent également servir à suivre l'évolution d'une greffe du pancréas ou d'îlots pancréatiques.

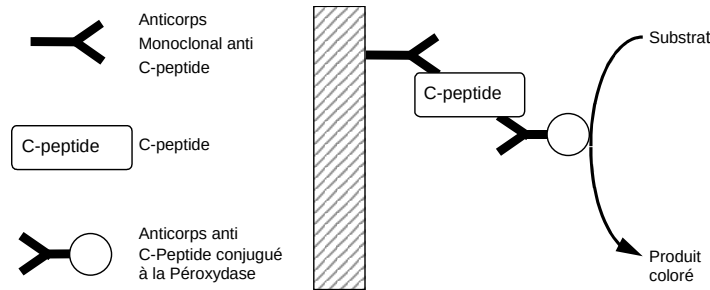
Jusqu'à une date récente, les mesures du peptide-C n'étaient possibles que dans le cadre d'un dosage radioimmunologique, même si des méthodes par chromatographie liquide à haute performance ont été décrites.² Le kit Dako C-Peptide est un test immunoenzymatique pour le dosage du peptide-C.

3 PRINCIPE DU TEST

Le kit Dako C-Peptide est un test ELISA basé sur l'utilisation de deux anticorps monoclonaux. L'incubation simultanée de l'échantillon et d'un anticorps marqué avec une enzyme dans une microplaque sensibilisée avec un anticorps anti-peptide-C entraîne la formation d'un complexe. Un seul lavage élimine l'anticorps marqué non fixé. Le conjugué lié est détecté par la réaction avec le substrat de l'enzyme (tétraméthyl 3,3', 5,5' benzidine, TMB). La réaction est arrêtée par l'ajout d'acide pour donner un résultat colorimétrique qui est lu spectrophotométriquement. L'utilisation dans le test de calibrateurs dont la concentration en peptide-C est connue permet de réaliser une courbe d'étalonnage à partir

de laquelle la concentration en peptide-C des échantillons peut être déterminée. Le principe du dosage est schématisé ci-dessous (Figure 1).

Figure 1: Principe du dosage de C-peptide avec le kit Dako



4 DEFINITIONS

Explication des symboles :

	Référence du catalogue
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour <N> tests
	Fabricant
	Dispositif médical de diagnostic <i>In vitro</i>
	Utiliser jusqu'à
	Code du lot
	Limites de température
	Verser de l'eau

5 REACTIFS FOURNIS

- 96 - Chaque kit contient suffisamment de réactifs pour la réalisation de 96 tests.
- La date de péremption du kit est indiquée sur l'étiquette extérieure de la boîte.

5.1 CONTENU DU KIT

Un livret d'instructions d'utilisation.

MICROTITRATION PLATE Une plaque de 96 micropuits répartis en 12 barrettes de 8 puits tapissés d'anticorps monoclonaux de souris anti peptide-C. Une poche plastique refermable est fournie pour le stockage des micropuits inutilisés.

Un flacon de chacun des produits suivants:

CALIBRATOR 1 5 mL de calibrateur 1: solution de protéine contenant un agent

(109467-003)

K6220/EFG/CKJ/2009.06.17 p. 16/43

antimicrobien.

CALIBRATOR 2
CALIBRATOR 3
CALIBRATOR 4
CALIBRATOR 5

Calibrateurs 2-5 (lyophilisés) : peptide-C biosynthétique dans une solution protéique contenant un agent antimicrobien. Le test est calibré selon un réactif de référence International Reference Reagent IRR 84/510 et les valeurs sont exprimées en ng/mL et en pmol/L (calculé à partir du poids moléculaire du peptide-C, 3020D). Les valeurs précises, exprimées dans les deux unités, sont portées sur la fiche de valeurs fournie avec le produit et elles doivent systématiquement être utilisées pour l'étalonnage du test. Les valeurs sont environ de :

Réactif	1	2	3	4	5
ng/mL	0	0.3	3	9	15
pmol/L	0	10	100	300	5000
		0	0	0	

CONJUGATE CONCENTRATE

2,5 mL de conjugué concentré: anticorps monoclonal anti-peptide-C conjugué à la peroxydase de raifort (PER) dans une solution tamponnée organique contenant une protéine, des sels minéraux, un colorant rouge et un agent antimicrobien.

CONJUGATE DILUENT

10 mL de diluant pour le conjugué: solution tamponnée organique contenant des sels minéraux, une protéine et un agent antimicrobien.

WASH BUFFER (15x)

28 mL de tampon de lavage concentré (x15): solution tamponnée organique contenant du détergent, des sels minéraux et un agent antimicrobien.

SUBSTRATE TMB

13 mL de substrat: peroxyde stabilisé et 3,3'-5,5'-tetraméthylbenzidine dans un tampon de dilution. Le TMB est un produit non cancérigène. Porter cependant des vêtements de protection et des gants appropriés pour éviter toute exposition directe.

STOP SOLUTION

13 mL de solution d'arrêt: acide sulfurique 0,46 mol/L .

5.2 RECONSTITUTION, STOCKAGE ET REUTILISATION DES ELEMENTS DU KIT

Le kit Dako Peptide-C permet d'effectuer jusqu'à 86 analyses d'échantillons en l'espace de 8 semaines. Afin d'assurer la performance optimale du kit, il est important de conserver tous les éléments reconstitués et inutilisés selon les recommandations suivantes.

5.2.1 Barrettes sensibilisées avec l'anticorps monoclonal - MICROTITRATION PLATE

Ouvrir la poche contenant la microplaque en coupant le long du joint. Séparer le nombre de micropuits requis, puis les fixer sur le support. **N'utiliser que des barrettes entières.** Remplacer les micropuits inutilisés dans la poche plastique refermable avec le dessiccateur, refermer soigneusement la poche et stocker à une température comprise entre 2 et 8 °C. Les micropuits peuvent être utilisés au cours des huit semaines suivant la première ouverture à condition qu'ils aient été conservés selon les instructions.

5.2.2 Calibrateur 1 - CALIBRATOR 1

Prêt à l'emploi. Conserver le calibrateur 1 inutilisé à une température comprise entre 2 et 8 °C. Le calibrateur 1 peut être utilisé à une température comprise entre 2 et 8 °C au cours des 8 semaines suivant la première ouverture à condition qu'il ait été conservé selon les instructions.

5.2.3 Calibrateurs 2 – 5 - CALIBRATOR 2/CALIBRATOR 3/CALIBRATOR 4/CALIBRATOR 5

Reconstituer les calibrateurs lyophilisés à l'aide d'1 mL d'eau fraîchement désionisée ou distillée. Une fois la reconstitution effectuée, jeter les bouchons. Laisser reposer 10 à 15 minutes à température ambiante, puis mélanger doucement avant utilisation. Aliquoter et stocker les calibrateurs reconstitués en position verticale pendant 5 jours au maximum à une température comprise entre 2 et 8 °C, ou pendant 8 semaines au maximum à une température de –20 °C.

5.2.4 Conjugué concentré et diluant conjugué CONJUGATE CONCENTRATE/CONJUGATE DILUENT

Diluer le conjugué concentré (2,5 mL) en y ajoutant du diluant conjugué (10 mL). La quantité de produit obtenue permet de traiter 96 micropuits. Mélanger doucement avant utilisation. Conserver le conjugué fraîchement dosé à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant 8 semaines au maximum.

5.2.5 Tampon de lavage concentré - WASH BUFFER (15x)

Fourni concentré 15x. Préparer une solution de lavage fraîchement dosée en ajoutant 1 unité de tampon de lavage à 14 unités d'eau désionisée ou distillée. Pour 96 micropuits, diluer 28 mL de tampon de lavage concentré avec 392 mL d'eau désionisée ou distillée afin d'obtenir un volume total de 420 mL. **Reconstituer la solution de lavage tamponnée fraîchement dosée, en fonction des besoins, le jour de son utilisation.** Conserver le concentré inutilisé à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Ne pas conserver le reste du tampon de lavage fraîchement dosé pour des utilisations ultérieures (voir la Section 8.2.11).

5.2.6 Solution de substrat - SUBSTRATE TMB

Fourni prêt à l'emploi. Conserver le substrat inutilisé à 2 – 8 °C à l'abri de la lumière.

5.2.7 Solution d'arrêt - STOP SOLUTION

Prêt à l'emploi. Stocker le réactif inutilisé à 2 – 8 °C.

6 REACTIFS SUPPLEMENTAIRES

6.1 REACTIFS

Eau distillée ou désionisée pour la reconstitution des calibrateurs 2-5 et la préparation du tampon de lavage fraîchement dosé.

6.2 ACCESSOIRES

Les produits suivants doivent être utilisés avec le C-peptide. Pour toute information complémentaire, veuillez contacter votre filiale ou votre distributeur local(e) Dako.

(109467-003)

K6220/EFG/CKJ/2009.06.17 p. 18/43

Le Diabetes Immunoassay Control Set (Code S6247) est un contrôle à trois niveaux destiné à être utilisé avec les dosages immuno-enzymatiques liés au diabète.

7 MATERIEL

Le matériel suivant est nécessaire:

Pipettes de précision et embouts jetables ou embouts de pipettes multicanalaires ajustables permettant de dispenser 25 µL - 250 µL.

Rigoles de réactifs en V.

Minuteur.

Papier absorbant propre (pour sécher les micropuits en les tapotant).

Eprouvette graduée de 500 mL.

Agitateur/secoueur pour plaque de microtitration. Pour obtenir des informations sur la conformité d'un agitateur/secoueur de plaque, veuillez contacter votre filiale ou votre distributeur local(e) Dako.

Appareil de lavage automatique pour microplaques (facultatif) ou matériel adapté au lavage de barrettes de huit micropuits (voir la section 10.2.4).

Spectrophotomètre ou lecteur de plaques EIA capable de lire l'absorbance à 450 nm avec plaque pour 96 micropuits répartis en barrettes de 8 puits. (facultatif: voir la section 10,3 intitulée Lecture des résultats).

Il existe pour ce test des Notes d'Application pour l'utilisation sur des systèmes automatisés ouverts. Veuillez contacter votre filiale ou votre distributeur local(e) Dako.

8 PRECAUTIONS

IVD - Pour un usage dans les diagnostics *in vitro*. Pour usage professionnel uniquement.

8.1 PRECAUTIONS DE SECURITE

- 8.1.1** La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique 0,46 mol/L. Eviter tout contact avec les yeux ou la peau par le port d'un vêtement de protection.
- 8.1.2** Les échantillons cliniques peuvent contenir des agents infectieux comme le virus de l'Hépatite B et celui du VIH. Tous les échantillons, calibrateurs, témoins et matériaux qui ont été en contact avec les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés en conséquence.
- 8.1.3** S'assurer que les coupures, écorchures ou lésions de la peau soient bien protégées pour éviter l'autoinoculation ou tout contact avec les muqueuses.
- 8.1.4** Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
- 8.1.5** Porter un équipement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.

- 8.1.6 Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.
- 8.1.7 Des Fiches techniques de sécurité (MSDS) sont disponibles sur demande pour les utilisateurs professionnels.

8.2 PRECAUTIONS TECHNIQUES

- 8.2.1 Ne pas utiliser les éléments du kit après la date d'expiration indiquée sur l'étiquette. Ne pas mélanger différents lots de réactifs.
- 8.2.2 Les performances du test seront altérées si les réactifs sont dilués de façon incorrecte, modifiés ou stockés dans des conditions autres que celles décrites dans la section 5.2.
- 8.2.3 Eviter toute contamination des réactifs.
- 8.2.4 Toujours s'assurer qu'aucune contamination ne s'est produite entre les puits. Il est important qu'il n'y ait aucune contamination entre l'anticorps monoclonal conjugué à l'enzyme et les réactifs ou le matériel. Une pipette distincte doit être utilisée pour la distribution du conjugué. Prendre soin de ne pas toucher ou éclabousser le rebord des puits avec le conjugué. Un conjugué qui a séché sur le rebord du puits peut interférer sur la performance du test.
- 8.2.5 Tout matériel de laboratoire, y compris l'automate de lavage et de manutention des liquides, doit être dépourvu de contamination microbienne, calibré correctement et entretenu conformément aux directives du fabricant.
- 8.2.6 Ne pas conserver le tampon de lavage fraîchement dosé inutilisé en vue d'une utilisation future. Lorsqu'ils ne sont pas utilisés, les réservoirs à tampon de lavage doivent être rincés avec de l'eau désionisée ou distillée, puis sécher à l'air libre.
- 8.2.7 Ne pas réutiliser les micropuits.
- 8.2.8 Ne pas utiliser de substrat présentant une coloration bleue avant l'ajout dans les micropuits.
- 8.2.9 Protéger le substrat de la lumière.
- 8.2.10 Il est recommandé de tester les échantillons en double jusqu'à ce que le personnel de laboratoire soit entièrement familiarisé avec le test.
- 8.2.11 Les résultats des tests doivent être interprétés en se basant également sur les études épidémiologiques et les évaluations cliniques du patient, et sur d'autres procédures diagnostiques.

9 PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Le kit Dako C-Peptide a été conçu pour être utilisé sur du sérum et du plasma humain.

9.1 SERUM

Prélever le sang par ponction veineuse dans des tubes qui ne contiennent pas d'additifs, laisser coaguler et séparer le sérum des cellules par centrifugation.

Conserver les échantillons jusqu'à 3 jours à 2 – 8 °C ou jusqu'à 28 jours à -20 °C. Aliquoter au besoin pour éviter la congélation et la décongélation répétées des échantillons et ne pas décongeler les échantillons en les chauffant.

9.2 PLASMA

Prélever le sang par ponction veineuse dans des tubes contenant de l'Héparine ou de l'EDTA comme anticoagulant. Centrifuger, séparer la fraction de plasma et conserver pendant 3 jours à 2 – 8 °C ou jusqu'à 28 jours à -20 °C. Aliquoter au besoin pour éviter la congélation et décongélation répétées des échantillons et ne pas décongeler les échantillons en les chauffant.

10 MODE D'EMPLOI DU TEST

PRIERE DE SE REFERER A LA SECTION 8.2 PRECAUTIONS TECHNIQUES AVANT D'EFFECTUER LE TEST

10.1 REMARQUES GENERALES

10.1.1 S'assurer que durant chaque série, les temps de réaction soient les mêmes en ajoutant les réactifs dans le même intervalle de temps.

10.1.2 Ne pipetter dans la rigole de réactif que la quantité de liquide nécessaire pour un dosage donné. **Ne pas remettre l'excédent de réactifs dans les flacons après usage.**

10.2 PROCEDURE DU DOSAGE

REMARQUE : Cette procédure de dosage nécessite l'emploi d'un agitateur/secoueur de plaque de microtitration. Pour obtenir des informations sur la conformité d'un agitateur/secoueur, veuillez contacter votre filiale ou votre distributeur local(e) Dako.

10.2.1 Ajout de calibrateurs, d'échantillons et de contrôles

Installer le nombre de barrettes de microtitration approprié sur le support des micropuits, en fonction du nombre de comptages requis. Pipeter 25 µL de calibrateur, d'échantillon ou de contrôle dans les micropuits. Pour les calibrateurs, il convient d'utiliser deux micropuits. **Veiller à noter l'emplacement de chaque échantillon de patient sur la plaque de microtitration.**

10.2.2 Ajout de conjugué

Une fois que tous les calibrateurs, échantillons ou contrôles ont été ajoutés, ajouter 100 µL de conjugué dans chaque micropuits. Eviter toute contamination croisée entre les micropuits.

10.2.3 Première incubation

Placer la plaque de microtitration sur l'agitateur/secoueur de plaque et agiter pendant les 60 minutes de l'incubation à une température comprise entre 20 et 30 °C.

10.2.4 Lavage des micropuits

Laver les micropuits à l'aide de tampon de lavage fraîchement dosé (voir la Section 5.2.5).

La technique de lavage utilisée a un impact majeur sur les performances du test. Veiller à complètement remplir (avec au moins **250 µL** de tampon de lavage fraîchement dosé) puis vider les puits.

Veiller impérativement à effectuer trois cycles de lavage par des techniques automatiques ou manuelles.

Lavage manuel

En cas de lavage manuel des micropuits, aspirer ou faire tomber le contenu des micropuits. Utiliser ensuite du tampon de lavage fraîchement dosé pour remplir complètement les micropuits, puis les vider entièrement. Entre chaque étape du processus de lavage, veiller à ôter tout tampon de lavage restant en tapotant les micropuits renversés sur un morceau de papier absorbant propre. Répéter deux fois ce processus et tournant la plaque après chaque lavage afin de commencer dans la direction opposée (pour 3 lavages au total). L'efficacité d'un lavage manuel est accrue si le tampon de lavage est introduit de façon inclinée afin de produire un tourbillon dans les micropuits. Après le dernier lavage, la plaque doit être renversée et tapotée sur du papier absorbant afin de faire disparaître toute trace de tampon de lavage.

Lavage automatique

Veiller à programmer 3 cycles de lavage sur les appareils de lavage automatiques. Les étapes d'impregnation sont inutiles. Les appareils de lavage doivent être correctement étalonnés afin d'assurer un remplissage et un vidage complets des micropuits entre chaque lavage. Après le dernier lavage, la plaque doit être renversée et tapotée sur du papier absorbant pour faire disparaître toute trace de tampon de lavage.

10.2.5 Addition du substrat et deuxième incubation

Ajouter 100 µL de solution de substrat à chaque micropuits. Placer la plaque de microtitration sur l'agitateur/secoueur de plaque et agiter pendant 10 minutes à une température comprise entre 20 et 30 °C.

Remarque : En cas d'utilisation d'un lecteur de plaque dont l'absorbance maximale est de 2,2 uA. ramener le temps d'incubation du substrat à 7 minutes.

10.2.6 Arrêt de la réaction

Ajouter 100 µL de solution d'arrêt dans chaque micropuits en maintenant le même intervalle de temps entre chaque barrette comme indiqué dans la section 10.2.5. Veiller à bien mélanger le contenu des micropuits.

10.3 LECTURE DES RESULTATS

10.3.1 LECTURE PHOTOMETRIQUE

La lecture photométrique de la plaque doit s'effectuer dans les 30 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt. **Protéger la plaque de la lumière jusqu'au moment de la lecture.** Mélanger le contenu des micropuits et lire l'absorbance de chaque micropuits à l'aide d'un spectrophotomètre approprié ou d'un lecteur de plaque EIA pouvant lire l'absorbance à 450 nm. S'assurer que le fond des micropuits est propre avant de procéder à la lecture, et vérifier qu'aucun corps étranger n'est présent dans les micropuits. Le lecteur doit effectuer un blanc sur l'air (c'est-à-dire en l'absence de plaque sur le support) avant que la plaque ne soit scannée.

En outre, si le spectrophotomètre, ou le lecteur de plaque EIA, permet l'utilisation d'une longueur d'onde de référence de 620 – 650 nm, une lecture à double longueur d'onde doit être effectuée afin d'éliminer toute interférence possible causée par des anomalies telles que la présence de poussière ou de marques sur la surface optique des micropuits.

10.4 RÉSUMÉ DU MODE D'EMPLOI DU KIT DAKO C-PEPTIDE

Vérifier que tous les réactifs sont à température ambiante (entre 15 et 30 °C) avant de les utiliser.

↓
Déposer 25 µL d'échantillon ou de calibrateur

↓
Ajouter 100 µL de conjugué **CONJUGATE**

↓
**Incuber pendant 60 minutes
à 20 - 30 °C (sous agitation)**

↓
Laver (x3)

↓
Ajouter 100 µL de substrat **SUBSTRATE TMB**

↓
**Incuber pendant 10 minutes
à 20-30°C (sous agitation)**

↓
Ajouter 100 µL de solution d'arrêt **STOP SOLUTION**

↓
Lire l'absorbance à 450 nm

11 CALCUL ET RESULTATS

La concentration en peptide-C des échantillons testés est évaluée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée manuellement ou automatiquement à l'aide d'un ordinateur.

11.1 CALCUL AUTOMATISE

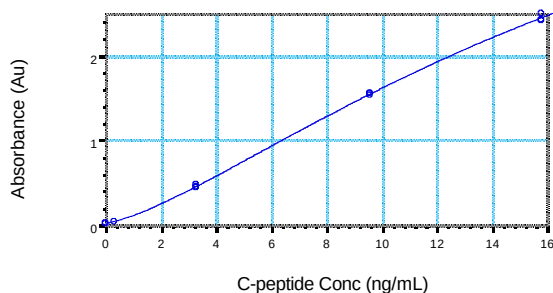
Consulter le manuel du lecteur de plaques. Inscrire le résultat de l'absorbance par rapport à la concentration de peptide-C des calibrateurs. Il est recommandé de réaliser la courbe d'étalonnage à partir de 4 points pour évaluer les résultats.

11.2 CALCUL MANUEL

Les résultats peuvent être calculés manuellement sur un papier graphique. Indiquer la concentration d'insuline sur l'axe des abscisses et l'absorbance sur l'axe des ordonnées. Réaliser la courbe d'étalonnage et l'utiliser pour déterminer la concentration en peptide-C dans les échantillons.

11.3 COURBE D'ETALONNAGE TYPIQUE

Figure 1: Courbe d'étalonnage réalisée avec le kit C-Peptide (ng/mL)



Remarque : Ce graphique n'est produit qu'à titre d'exemple et ne doit pas être utilisé pour la détermination des résultats.

11.4 DILUTION DES ECHANTILLONS TRES CONCENTRES

Les échantillons dont les concentrations de peptide-C sont supérieures à celle du calibrateur le plus concentré doivent être dilués dans une proportion de 1 à 4 (v/v) à l'aide du calibrateur 1 avant de procéder au dosage.

12 LIMITES DU TEST

12.1 INTERFERENCES

Les évaluations cliniques indiquent que de fortes concentrations en lipides ou bilirubine dans les échantillons n'interfèrent pas sur les résultats du kit C-Peptide.

Il n'y a pas d'interférence liée au facteur rhumatoïde ou à des anticorps hétérophiles.

12.2 HÉMOLYSE

Les échantillons très fortement hémolysés ne doivent pas être utilisés.

12.3 EFFET DE ZONE

Dans des systèmes de dosage immunologique de type sandwich, la courbe de réponse peut s'inverser en présence de très forte concentration en peptide-C. Dans le test Peptide-C, cet effet se produit à des concentrations supérieures à 120 ng/ml (40 000 pmol/l) en peptide-C.

12.4 SERUM ET PLASMA

Le sérum et le plasma peuvent être utilisés. Pendant l'évaluation clinique, aucune différence notable d'un point de vue clinique n'a été trouvée en dosant le peptide-C dans les sérums et les échantillons de plasma correspondants. L'héparine ou l' EDTA peuvent être utilisés.

12.5 REACTIVITE CROISEE AVEC LA PROINSULINE

Même si la concentration molaire en peptide-C est 50 fois supérieure à celle de proinsuline, les échantillons avec de fortes concentrations en proinsuline provoquent une augmentation des valeurs en peptide-C (voir chapitre 14.2.3).

La présence de complexes proinsuline/anticorps anti-insuline chez certains patients peut aussi interférer avec le test. Il est préférable alors de mesurer le niveau en peptide-C après précipitation au polyéthylène glycol (PEG)³.

12.6 INSUFFISANCE RENALE

Le rein étant le site principal pour le métabolisme du peptide-C, les patients atteints d'une sévère insuffisance rénale peuvent présenter des niveaux anormalement élevés en peptide-C circulant.

12.7 LES EXPERTISES MEDICO-LEGALES

Le kit Dako pour l'analyse du peptide-C n'est pas approprié à une utilisation dans le domaine des expertises médico-légales et n'a été pas validé avec des échantillons d'autopsies.

13 VALEURS ATTENDUES

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs de référence.

Les intervalles de référence peuvent varier considérablement selon les méthodes. Ne pas utiliser de valeurs de référence établies avec d'autres méthodes.

14 PERFORMANCE DU KIT

Les données présentées dans cette section ont été obtenues lors d'évaluations cliniques indépendantes et/ou d'évaluations cliniques effectuées par Dako.

14.1 PRECISION

14.1.1 Précision intra-essai

3 lots d'échantillons de patients dont les concentrations en peptide-C sont réparties dans l'intervalle de mesure ont été testés 24 fois chacun sur une seule plaque.

Lot	n	Moy.	E-T (ng/mL)	Moy.	E-T (pmol/L)	CV (%)
1	24	1.55	0.04	513	13.3	2.6
2	24	3.6	0.12	1190	39.3	3.3
3	24	6.2	0.24	2050	80.0	3.9

E.T.: écart type

14.1.2 Précision inter-essai

3 lots d'échantillons dont les concentrations en peptide-C sont réparties dans l'intervalle de mesure ont été testés dans le cadre de 10 dosages.

Lot	n	Moy.	E-T (ng/mL)	Moy.	E-T (pmol/L)	CV (%)
1	10	1.77	0.08	586	26.4	4.5
2	10	3.4	0.05	1130	17.0	1.5
3	10	5.1	0.17	1690	55.8	3.3

14.1.3 Limite de détection (Sensibilité)

La limite de détection a été évaluée dans le cadre de 2 dosages en testant 20 calibrateurs

1. La valeur moyenne obtenue correspond à 2,5 écarts-type du signal moyen du calibrateur 1.

Limite de détection : 0,09 ng/mL (30 pmol/L).

14.2 EXACTITUDE

14.2.1 Linéarité

3 échantillons (plasma-héparine) dont les concentrations en peptide-C sont très fortes ont été dilués avec le calibrateur 1.

Echantillon	Facteur de dilution	Resultat (ng/mL)	Observé/Attendu (%)
1	Neat	7.6	
	1:2	3.8	100
	1:4	2.0	105
2	Neat	8.0	
	1:2	4.1	103
	1:4	2.1	105
3	Neat	8.1	
	1:2	4.1	101
	1:4	2.1	104

14.2.2 Corrélation

3 échantillons, dont les concentrations en peptide-C sont faibles, ont été additionnés avec différentes concentrations de peptide-C et la corrélation a été calculée en pourcentage.

Peptide-C ajouté (ng/mL)	Resultat (ng/mL)	Correlation (%)
Lot	2.4	
Lot 1 + 1.9	4.3	100
Lot 1 + 4.3	6.7	100
Lot 1 + 7.8	9.7	94
Lot 2	1.9	
Lot 2 + 1.9	3.6	90
Lot 2 + 4.3	5.9	93
Lot 2 + 7.8	9.5	97
Lot 3	1.5	
Lot 3 + 1.9	3.5	105
Lot 3 + 4.3	6.0	105
Lot 3 + 7.8	9.3	100

14.2.3 Réactivité croisée

La spécificité du dosage a été évaluée en étudiant la réaction croisée avec des peptides et des hormones apparentés de part leur structure au peptide-C.

La réactivité croisée (en %) a été calculée à partir de la masse de peptide-C et de la masse de la molécule présentant une réaction croisée et donnant le même signal.

Molécule à analyser	Réactivité croisée (%)
Proinsuline humaine intacte (biosynthétique)	84
Proinsuline 32-33	83
Insuline humaine	0*

* L'insuline a une concentration de 240,000 pmol/L était à une était en dessous du seuil de détection du peptide-C.

Les concentrations à jeûn de proinsulines sont de l'ordre de 1 à 2% des concentrations en peptide-C. La réactivité croisée n'est donc pas cliniquement significative pour ces molécules.

1 VERWENDUNGSZWECK

Dako C-Peptide ELISA Kit ist ein Enzymimmunassay (ELISA) zur quantitativen Bestimmung von C-Peptid in humanem Serum und Plasma.

2 ZUSAMMENFASSUNG

C-Peptide wird bei der Verarbeitung von Insulin in den β -Zellen des Pankreas gebildet. Proinsulin wird dort proteolytisch in äquimolare Mengen von ausgereiftem Insulin und C-Peptide gespalten, die beide über die Pfortader in den Blutkreislauf sezerniert werden. Das C-Peptide, das nach seiner Funktion der Verbindung von A- und B-Kette des Insulins im Proinsulinmolekül benannt wurde, besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit 31 Aminosäuren (MG 3020 Da) und hat im Gegensatz zu Insulin keine bekannte physiologische Funktion. Aufgrund der im Vergleich zu Insulin längeren Halbwertszeit (Faktor 2-5) sind die C-Peptide-Konzentrationen im peripheren Blutkreislauf höher und weisen geringere Schwankungen auf als Insulin. Deshalb können die C-Peptide-Konzentrationen im Plasma die Insulinsekretion aus dem Pankreas mit größerer Zuverlässigkeit widerspiegeln als die Insulinkonzentration selbst.¹

Die C-Peptide-Bestimmung wird für folgende klinischen Anwendungen durchgeführt:¹

1. Zur Beurteilung der noch vorhandenen β -Zellfunktion bei Patienten, die mit Insulin behandelt wurden, und zur Unterscheidung zwischen Diabetes Typ 1 und Typ 2. Der C-Peptide-Test ist bei der Entscheidung zur Anwendung der Insulintherapie bei Diabetes Typ 2 von besonderem Interesse.
2. Zur Diagnose einer künstlichen Hypoglykämie. Eine unerlaubte Insulinverabreichung führt zu hohen Insulinkonzentrationen, ohne dass die C-Peptide-Konzentrationen erhöht werden.
3. Zur Insulinomdiagnose, insbesondere bei mit Insulin behandelten Patienten. Die C-Peptide-Bestimmung wird bei euglykämischen Patienten mit Verdacht auf Insulinom in Insulin-Suppressionstests eingesetzt. Sind die C-Peptide-Konzentrationen in diesem Test erhöht, weist dies auf ein Insulinom hin.
4. Als Indikator für noch vorhandenes Pankreasgewebe nach einer Pankreatektomie. Im Fall eines Insulinoms kann die C-Peptide-Bestimmung zum Nachweis von Metastasen und zur Kontrolle des Therapieverlaufs herangezogen werden. Darüber hinaus kann sie auch zur Überwachung des Verlaufs einer Pankreas- oder Inselzell-Transplantation dienen.

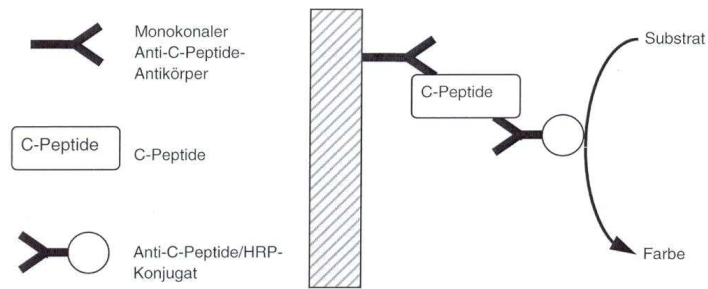
Bis vor Kurzem war eine routinemäßige C-Peptide-Bestimmung nur mittels Radioimmunassay möglich, obwohl HPLC-Methoden in der Literatur beschrieben worden sind.² Der Dako C-Peptide-Test ist ein Enzymimmunassay zur quantitativen Bestimmung von C-Peptide.

3 TESTPRINZIP

Dako C-Peptide ist ein ELISA-Test mit zwei monoklonalen Antikörpern. In einer Mikrottestplatte, die mit einem spezifischen Anti-C-Peptide-Antikörper beschichtet ist, werden die Probe und der enzymmarkierte Antikörper gleichzeitig inkubiert. Dadurch bildet sich ein Komplex. Der ungebundene enzymmarkierte Antikörper wird mit einem einfachen Waschschritt entfernt. Das gebundene Konjugat wird durch seine Reaktion mit dem Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen.

Die Reaktion wird durch Zugabe von Säure gestoppt und die resultierende Farbintensität spektralphotometrisch gemessen. Der Einsatz von Kalibratoren mit bekannter C-Peptide-Konzentration im Test ermöglicht die Erstellung einer Kalibrierungskurve, mit deren Hilfe die C-Peptide-Konzentration in Patientenproben bestimmt werden kann. Das Testprinzip ist in Abbildung 1 dargestellt.

Abbildung 1: Testprinzip des Dako C-Peptide-Tests



4 DEFINITIONEN

Erläuterung der Symbole:

REF	Bestellnummer
	Gebrauchsanweisung beachten
	Inhalt ausreichend für „n“ Ansätze
	Hersteller
IVD	In-Vitro-Diagnostikum
	Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung
	Zulässiger Temperaturbereich
	Wasser zusetzen

5 GELIEFERTES REAGENZ

- 96 - Jeder Testkit enthält genügend Material für 96 Bestimmungen.
- Die Haltbarkeit des Testkits ist auf dem äußeren Verpackungsetikett vermerkt.

5.1 INHALT DES DAKO C-PEPTIDE-TESTKITS

	Eine Gebrauchsanweisung.
MICROTITRATION PLATE	Eine x96-Kavitätenplatte mit 12, 8 Kavitätenstreifen, die mit Anti-C-Peptide-Antikörper der monoklonalen Maus beschichtet sind. Eine wiederverschließbare Plastiktasche

(109467-003)

K6220/EFG/CKJ/2009.06.17 p. 29/43

zur Lagerung unbenutzter Kavitäten ist ebenfalls mitgeliefert.

Jeweils eine Flasche der folgenden Reagenzien, sofern nicht anders angegeben:

CALIBRATOR 1

5 mL Kalibrator: Proteinmatrix mit antibakteriellem Wirkstoff.

CALIBRATOR 2

CALIBRATOR 3

CALIBRATOR 4

CALIBRATOR 5

Kalibratoren 2 - 5 (lyophilisiert): Synthetisches C-Peptide in einer mit einem antibakteriellen Wirkstoff versehenen Proteinmatrix. Der Test ist gegen International Reference Reagent IRR 84/510 kalibriert und die Werte werden sowohl in ng/mL als auch in SI-Einheiten (pmol/L, anhand des Molekulargewichts des C-Peptides von 3020 Da berechnet) angegeben. Die genauen Werte werden in beiden Maßeinheiten auf dem der Packung beiliegenden Werteblatt angegeben und müssen stets für die Kalibrierung des Tests verwendet werden. Die ungefähren Werte sind:

Kalibrator	1	2	3	4	5
ng/mL	0	0.3	3	9	15
pmol/L	0	10	100	300	5000
		0	0	0	

CONJUGATE CONCENTRATE

2,5 mL Konjugatkonzentrat: Monoklonaler Anti-C-Peptid-Antikörper gegen Meerettichperoxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) konjugiert in einer organischen Pufferlösung, die Protein, anorganische Salze, einen roten Farbstoff und einen antibakteriellen Wirkstoff enthält.

CONJUGATE DILUENT

10 mL Konjugatverdünnungsmittel: Organische Pufferlösung mit anorganischen Salzen, Protein und antibakteriellem Wirkstoff.

WASH BUFFER (15x)

28 mL Waschpufferkonzentrat (15x): Organische Pufferlösung mit Detergenz, anorganischen Salzen und antibakteriellem Wirkstoff.

SUBSTRATE TMB

13 mL Substrat: stabilisiertes Peroxyd und 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in einer Verdünnungspufferlösung. TMB wird als nicht karzinogen betrachtet. Trotzdem wird empfohlen, Schutzkleidung zu tragen, um einen direkten Kontakt zu vermeiden.

STOP SOLUTION

13 mL Stopplösung: 0,46 mol/L Schwefelsäure.

5.2 REKONSTITUTION, LAGERUNG UND WIEDERVERWENDUNG DER TESTKIT-BESTANDTEILE

Mit dem Dako C-Peptide-Testkit können bis zu 86 Patientenproben in einem Zeitraum von 8 Wochen getestet werden. Um die optimale Leistungsfähigkeit des Testkits sicherzustellen, ist es wichtig, alle rekonstituierten und noch nicht gebrauchten Kit-Bestandteile folgendermaßen aufzubewahren:

5.2.1 Mit monoklonalem Antikörper beschichtete Kavitäten – MICROTITRATION PLATE

Die Plattentasche durch Schneiden entlang der Schweißnaht öffnen. Die gewünschte Anzahl von Kavitätenstreifen abbrechen und sie in das Gestell setzen. **Ausschließlich vollständige Streifen verwenden.** Unbenutzte Kavitäten mit dem Trockenmittel in die wiederverschließbare Tasche legen, Tasche sorgfältig wiederverschließen und bei 2-8 °C lagern. Bei dieser sachgemäßen Lagerung können die Kavitäten nach dem ersten Öffnen der Tasche bis zu 8 Wochen lang verwendet werden.

5.2.2 Kalibrator 1 - CALIBRATOR 1

Gebrauchsfertig. Unbenutzten Kalibrator 1 bei 2-8 °C lagern. Bei sachgemäßer Lagerung kann der Kalibrator 1 nach dem ersten Öffnen bis zu 8 Wochen lang verwendet werden.

5.2.3 Kalibratoren 2 - 5 - CALIBRATOR 2CALIBRATOR 3CALIBRATOR 4CALIBRATOR 5

Die lyophilisierten Kalibratoren mit 1 mL frischem destilliertem Wasser oder deionisiertem Wasser rekonstituieren. Die Stopper nach der Rekonstituierung werfen. Lösung 10-15 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen lassen und vor Gebrauch sanft mischen. Rekonstituierte Kalibratoren aufrecht stehend bei 2-8 °C bis zu 5 Tage lang oder bei -20 °C bis zu 8 Wochen lang aliquotieren und lagern.

5.2.4 Konjugatkonzentrat- und Konjugatverdünnungsmittel – CONJUGATE CONCENTRATECONJUGATE DILUENT

Das Konjugatkonzentrat (2,5 mL) durch Hinzufügen von Konjugatverdünnungsmittel (10 mL) verdünnen. Das ist ausreichend für 96 Kavitäten. Vor Gebrauch sanft mischen. Konjugat in Arbeitskonzentration bei 2-8 °C bis zu 8 Wochen lang lagern.

5.2.5 Waschpufferkonzentrat - WASH BUFFER (15x)

15x-Konzentrat liegt dem Kit bei. Waschpuffer in Arbeitskonzentration durch Hinzufügen von 1 Teil Waschpuffer auf 14 Teile frisches deionisiertes oder destilliertes Wasser ansetzen. Für 96 Kavitäten werden 28 mL Waschpufferkonzentrat mit 392 mL deionisiertem oder destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 420 mL. **Es sollte nur soviel Waschpuffer angesetzt werden, wie am Versuchstag benötigt wird.** Nicht benötigtes Konzentrat bei 2-8 °C aufbewahren.

Unverbrauchte Reste von Waschpuffer in Arbeitskonzentration dürfen nicht für eine spätere Verwendung aufbewahrt werden (siehe Abschnitt 8.2.11).

5.2.6 Substratlösung - SUBSTRATE TMB

Gebrauchsfertig. Restliches Substrat bei 2-8 °C lichtgeschützt aufbewahren.

5.2.7 Stopplösung - STOP SOLUTION

Gebrauchsfertig. Nicht verwendetes Reagenz bei 2-8 °C lagern.

6 ZUSÄTZLICHE REAGENZIEN

6.1 REAGENZIEN

Destilliertes oder deionisiertes Wasser zur Rekonstitution der Kalibratoren 2-5 und zum Ansetzen der Waschpuffer in Arbeitskonzentration.

6.2 ZUBEHÖR UND GERÄTE

Die folgenden Produkte sind zur Verwendung zusammen mit C-Peptide bestimmt. Bei Anfragen jeglicher Art wenden Sie sich bitte an die für Sie zuständige Dako-Niederlassung oder an Ihren Händler.

Das Diabetes Immunoassay Control Set (Code-Nr. S6247) ist als dreifache Kontrolle zur Verwendung mit Diabetis-Immunoassays bestimmt.

7 AUSSTATTUNG

Die folgenden Ausstattungsgegenstände sind erforderlich:

Präzisionspipetten und Einwegspitzen oder einstellbare Mehrkanal-Pipettenspitzen für 25 µL – 250 µL.

V-förmige Reagenzienbehälter.

Stoppuhr.

Sauberes und saugfähiges Papier (zum Abklopfen der Kavitäten).

Messzylinder 500 mL.

Mikrotitrierplattenschüttler. Bitte wenden Sie sich an die für Sie zuständige Dako-Niederlassung oder an Ihren Händler, um weitere Informationen über die Eignung des Plattenschüttlers zu erhalten.

Automatisierter Plattenwascher (als Option) oder geeignete Ausstattung zum Waschen von 8 Kavitätenstreifen (Abschnitt 10.2.4).

Spektrophotometer oder EIA-Plattenleser zum Ablesen einer 96-Kavitäten-Platte mit 8 Kavitätenstreifen bei einer Absorption von 450 nm und mit einer Referenz von 620-650 nm. (Option, Abschnitt 10.3, Ablesen der Testergebnisse).

Anwendungshinweise für die Verwendung auf offenen automatisierten Systemen stehen für diesen Test zur Verfügung. Bitte wenden Sie sich an Ihre Dako-Vertretung bzw. Ihren Händler.

8 VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD - *In vitro*-Diagnostikum. Nur für Fachpersonal bestimmt.

8.1 SICHERHEITSMASSNAHMEN

8.1.1 Die Stopplösung besteht aus 0,46 mol/L Schwefelsäure. Augen- und Hautkontakt durch das Tragen von Schutzbrille und Schutzkleidung vermeiden.

Bei versehentlichem Kontakt mit diesem Reagenz betroffene Stellen sofort mit Wasser waschen.

- 8.1.2 Klinische Proben können infektiöse Stoffe wie z.B. Hepatitis B-Virus und HIV enthalten. Alle Proben, Kalibratoren, Kontrollen und Materialien, die mit den klinischen Proben in Berührung kommen, sollten als potenziell infektiös angesehen und entsprechend gehandhabt werden.
- 8.1.3 Sicherstellen, dass Schnitt- und Schürfwunden sowie Hautverletzungen in geeigneter Weise geschützt sind, und Vorkehrungen treffen, um eine Eigeninokulation bzw. Spritzer auf die Schleimhäute zu vermeiden.
- 8.1.4 Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
- 8.1.5 Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
- 8.1.6 Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.
- 8.1.7 Sicherheitsdatenblätter für geschultes Fachpersonal sind auf Anfrage erhältlich.

8.2 TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- 8.2.1 Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums nicht länger verwendet werden. Unterschiedliche Reagenzienchargen nicht mischen.
- 8.2.2 Falls Reagenzien inkorrekt verdünnt, modifiziert oder unter anderen Bedingungen als den in Abschnitt 5.2 beschriebenen Bedingungen gelagert werden, könnte die Testleistung beeinträchtigt werden.
- 8.2.3 Verunreinigung von Reagenzien vermeiden.
- 8.2.4 Es müssen alle Anstrengungen unternommen werden, um eine Kreuzkontamination zwischen Kavitäten zu vermeiden. Es ist ebenfalls von größter Bedeutung, dass enzymkonjugierter monoklonaler Antikörper die Reagenzien und Ausstattung nicht verunreinigt. Das Konjugat sollte mit einer separaten Pipette entnommen werden und es muss darauf geachtet werden, den Rand der Kavität nicht zu berühren oder zu benetzen. Konjugat, das auf dem Rand der Kavität antrocknet, könnte die Testleistung beeinträchtigen.
- 8.2.5 Alle Ausstattungsgegenstände einschließlich Reinigungsgeräten und Geräten zur Handhabung von Flüssigkeiten müssen frei von bakteriellen Verunreinigungen sowie korrekt kalibriert und den Herstelleranweisungen entsprechend gepflegt sein.
- 8.2.6 Restlichen gebrauchsfertigen Waschpuffer nicht für späteren Gebrauch aufbewahren. Nicht gebrauchte Waschpuffergefäße mit destilliertem Wasser spülen und trocknen lassen.
- 8.2.7 Kavitäten können nicht wiederverwendet werden.
- 8.2.8 Substrat, das vor dem Hinzugeben zu den Kavitäten eine blaue Färbung aufweist, darf nicht verwendet werden.
- 8.2.9 Substrat vor Lichteinwirkung schützen.

8.2.10 Es wird empfohlen, Proben so lange im Duplikat zu verarbeiten, bis das Labor sich vollkommen auf die Benutzung der Tests eingestellt hat.

8.2.11 Die Testergebnisse sollten zusammen mit weiteren Informationen beurteilt werden, die aus epidemiologischen Studien, klinischen Patientenbeurteilungen und anderen diagnostischen Verfahren verfügbar sind.

9 PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Dako C-Peptide ist für die C-Peptide-Bestimmung in humanem Serum und Plasma bestimmt.

9.1 SERUM

Blutproben über Venenpunktur sammeln, auf natürliche Weise gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation von den Zellen trennen. Die Proben können entweder bis zu 3 Tagen bei 2-8 °C oder bis zu 28 Tagen bei -20 °C aufbewahrt werden. Proben bei Bedarf aliquotieren, um ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Beim Auftauen eingefrorener Proben darf die Raumtemperatur nicht überschritten werden.

9.2 PLASMA

Blutproben über Venenpunktur in Röhrchen sammeln, die als Antikoagulant Heparin oder EDTA enthalten. Plasmafraktion über einen Zentrifugationsschritt abtrennen und bis zu 3 Tagen bei 2-8 °C oder bis zu 28 Tagen bei -20 °C lagern. Proben bei Bedarf aliquotieren, um ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Beim Auftauen eingefrorener Proben darf die Raumtemperatur nicht überschritten werden.

10 TESTDURCHFÜHRUNG

BEACHTEN SIE BITTE DIE TECHNISCHEN VORSICHTSMASSNAHMEN IN ABSCHNITT 8.2, BEVOR SIE DIESEN TEST DURCHFÜHREN.

10.1 ALLGEMEINE HINWEISE

10.1.1 Die Inkubationszeiten sind genau einzuhalten, d.h. es muss gewährleistet sein, dass die einzelnen Reagenzien bei jedem Lauf in der gleichen zeitlichen Abfolge zugegeben werden.

10.1.2 Nur die für den jeweiligen Test erforderliche Flüssigkeitsmenge in den Reagenzienbehälter pipettieren. **Nicht benötigte Reagenzien nach Gebrauch auf keinen Fall wieder in die Originalfläschchen zurückfüllen.**

10.2 TESTPROZEDUR

HINWEIS: Die Testprozedur erfordert die Verwendung eines Mikrotitrationsplattenschüttlers. Bitte wenden Sie sich an die für Sie zuständige Dako-Niederlassung oder an Ihren Händler, um weitere Informationen über die Eignung des Plattenschüttlers zu erhalten.

10.2.1 Kalibrator, Probe und Kontrollzusatz

Die erforderliche Anzahl von Mikrotitrationsstreifen (gemäß der Anzahl der erforderlichen Bestimmungen) in den Kavitätenhalter stellen. 25 µL Kalibrator, Probe oder Kontrolle in die Kavitäten pipettieren. Für die Kalibratoren sollten zweifache Kavitäten verwendet werden.

Die Position jeder Patientenprobe auf der Mikrotiterplatte muss festgehalten werden.

10.2.2 Konjugatzusatz

Nachdem alle Kalibratoren, Proben oder Kontrollen hinzugegeben worden sind, 100 µL Konjugat in jede Kavität geben. Kreuzkontamination zwischen Kavitäten vermeiden.

10.2.3 Erste Inkubation

Die Mikrotiterplatte auf dem Plattenschüttler platzieren und während des Zeitraums der Inkubation von 60 Minuten bei 20-30 °C schütteln lassen.

10.2.4 Die Kavitäten waschen

Die Kavitäten sollten unter Verwendung des Waschpuffers bei Arbeitskonzentration gewaschen werden (Abschnitt 5.2.5).

Die Waschtechnik ist für die Testleistung von ausschlagender Bedeutung und sollte so durchgeführt werden, dass eine vollständige Füllung und Entleerung der Kavitäten gewährleistet wird (mit mindestens **250 µL** Waschpuffer bei Arbeitskonzentration).

Es werden drei Waschzyklen verlangt, entweder mittels automatisierter oder manueller Waschtechniken.

Manuelles Waschen

Falls Kavitäten manuell gewaschen werden, muss ihr Inhalt aspiriert oder ausgeschüttelt und ein frisch angesetzter Waschpuffer verwendet werden, wobei darauf geachtet werden muss, dass die Kavitäten vollständig gefüllt und entleert werden. Zwischen den Waschschritten muss der gesamte restliche Waschpuffer entfernt werden: dazu werden die umgedrehten Kavitäten auf sauberem und saugfähigem Papier abgeklopft. Dieser Prozess wird zweimal wiederholt, wobei die Platte nach jedem Waschschrift gedreht wird, um in der entgegengesetzten Richtung zu beginnen (insgesamt 3 Waschschriffe). Die Effizienz der manuellen Waschtechnik wird weiterhin gewährleistet, wenn der Waschpuffer in einem schrägen Winkel in die Kavitäten gegeben wird und somit einen Wirbel in den Kavitäten erzeugt. Nach dem abschließenden Waschschrift sollte die Platte umgedreht und auf saugfähigem Papier abgeklopft werden, um die letzten Reste des Waschpuffers zu entfernen.

Automatisiertes Waschen

Automatisierte Waschmaschinen sollten auf die Durchführung von 3 Waschzyklen programmiert werden. Einweichschritte sind nicht erforderlich. Waschgeräte müssen korrekt kalibriert werden, um das vollständige Füllen und Entleeren der Kavitäten zwischen jedem Waschen zu gewährleisten. Nach dem abschließenden Waschschrift sollte die Platte umgedreht und auf saugfähigem Papier abgeklopft werden, um die letzten Reste des Waschpuffers zu entfernen.

10.2.5 Substratzugabe und zweite Inkubation

100 µL Substratlösung zu jedem Kavität hinzugeben. Die Mikrotiterplatte auf dem Plattenschüttler platzieren und 10 Minuten lang bei 20-30 °C schütteln lassen.

Hinweis: Falls ein Plattenlesegerät mit einer maximalen Absorption von 2,2 AU verwendet wird, muss die Substratinkubationszeit auf 7 Minuten verringert werden.

10.2.6 Die Reaktion anhalten

100 µL Stopplösung zu jeder Kavität hinzugeben, wobei dieselben Zeitabstände zwischen den einzelnen Streifen wie in Abschnitt 10.2.5 eingehalten werden müssen. Sicherstellen, dass der Inhalt der Kavitäten gründlich gemischt wird.

10.3 ABLESEN DER TESTERGEBNISSE

10.3.1 PHOTOMETRISCHE ABLESUNG

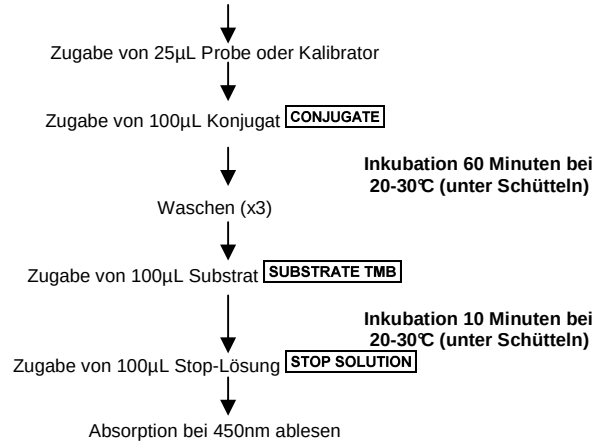
Die Platte muss innerhalb von 30 Minuten nach der Hinzugabe der Stopplösung photometrisch abgelesen werden.

Die Platte bis zur Ablesung vor Lichteinfall schützen. Die Inhalte der Kavitäten mischen und die Absorption jeder Kavität mittels eines geeigneten Spektrophotometers oder EIA-Plattenlesegeräts bei 450 nm ablesen. Vor der Ablesung sicherstellen, dass die Böden der Kavitäten sauber sind, und überprüfen, dass sich keine Fremdkörper in den Kavitäten befinden. Das Lesegerät sollte vor dem Scannen der Platte gegen Luft gemessen werden (d.h. ohne eine Platte auf dem Träger).

Falls das Spektrophotometer oder EIA-Plattenlesegerät die Verwendung einer Referenzwellenlänge (620 bis 650 nm) gestattet, sollten duale Wellenlängenablesungen durchgeführt werden, die jegliche potenzielle Interferenz aufgrund von Abweichungen durch Schmutz oder Kratzer auf der optischen Oberfläche der Kavitäten ausschließen.

10.4 SCHEMA DER DAKO C-PEPTIDE-TESTDURCHFÜHRUNG

Sicherstellen, dass alle Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (15-30 °C) aufgewärmt worden sind.



11 BERECHNUNG UND ERGEBNISSE

Die Meßergebnisse der Patientenprobe werden anhand einer Kalibrierungskurve ermittelt, die entweder manuell oder automatisch mit dem Computer erstellt wurde.

11.1 AUTOMATISCHE BERECHNUNG

Anweisungen können dem Handbuch zum Plattenlesegerät entnommen werden. Die gemessenen Absorptionswerte werden gegen die C-Peptide-Konzentration der Kalibratoren aufgetragen. Zur Erstellung der Kalibrierungskurve, aus der die Patientenwerte abgelesen werden, wird eine 4-Punkte-Parameterkurve empfohlen.

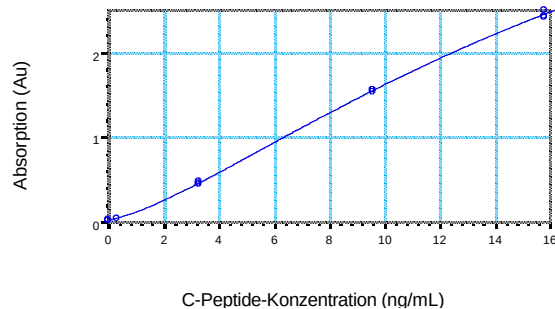
Entsprechend der Natur dieser Kurvenanpassung an vier Punkte, kann es erforderlich sein, den Wert des Kalibrators 1 mit 0,001 festzusetzen, um einen Kurvenverlauf durch alle Datenpunkte sicherzustellen. Wenden Sie sich bei weiterführenden Fragen bitte an die für Sie zuständige Dako-Niederlassung oder Ihren Händler.

11.2 MANUELLE BERECHNUNG

Die Ergebnisse können manuell auf Millimeterpapier berechnet werden. Hierbei wird die C-Peptide-Konzentration auf der X-Achse gegen die Absorption auf der Y-Achse (beides im linearen Maßstab) aufgetragen, eine Kalibrierungskurve erstellt und daraus die C-Peptide-Konzentration in den einzelnen Patientenproben abgelesen.

11.3 TYPISCHE KALIBRIERUNGSKURVE

Eine typische Kalibrierungskurve des C-Peptide-Tests (ng/mL)



Hinweis: Diese graphische Darstellung dient nur der Illustration und darf keinesfalls zur Berechnung von Ergebnissen benutzt werden.

11.4 VERDÜNNUNG VON HOCHKONZENTRIERTEN PROBEN

Proben, deren C-Peptide-Konzentration voraussichtlich über dem höchsten Kalibrator liegen wird, sollten vor der Testdurchführung mit dem Kalibrator 1, 1/4 (v/v) verdünnt werden.

12 EINSCHRÄNKUNGEN DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT DES TESTS

12.1 INTERFERENZEN

Externe klinische Evaluierungen haben gezeigt, dass Proben mit hohen Lipid- oder Bilirubinkonzentrationen mit dem C-Peptide-Test nicht interferieren.

Es wurde keine Beeinträchtigungen durch Rheumafaktor oder heterophile Antikörper beobachtet.

12.2 HÄMOLYSE

Stark hämolysierte Proben sollten nicht eingesetzt werden, da dies zu niedrigeren Werten führen könnte.

12.3 "HIGH DOSE HOOK-EFFEKT"

In Sandwich-Immunassays kann sich die Antwortkurve in Gegenwart extrem hoher Analytkonzentrationen umkehren. Im C-Peptide-Test tritt dies ein, wenn die C-Peptide-Konzentration größer als 120 ng/mL (40.000 pmol/L) ist.

12.4 SERUM UND PLASMA

In den Tests können sowohl Serum als auch Plasma eingesetzt werden. Während der klinischen Evaluierungsphase wurden keine klinisch signifikanten Unterschiede bei der C-Peptide-Bestimmung von zusammengehörigen Serum- und Plasmaproben beobachtet. Als Antikoagulantien können sowohl Heparin als auch EDTA verwendet werden.

12.5 PROINSULIN UND PROINSULINKOMPLEXE

Obwohl zirkulierendes C-Peptide im Vergleich zu Proinsulin in 50-fachem molarem Überschuss vorliegt, führen Proben mit erhöhter Proinsulin-Konzentration im C-Peptide-Test zu erhöhten C-Peptide-Werten (Abschnitt 14.2.3).

Auch die bei manchen Patienten zirkulierenden Proinsulin/Anti-Insulin-Antikörper-Komplexe können den Test beeinträchtigen. In solchen Fällen sollten die C-Peptide-Konzentrationen nach der Präzipitation der Immunkomplexe mit Polyethylenglycol (PEG) bestimmt werden.³

12.6 NIERENINSUFFIZIENZ

Da das C-Peptide hauptsächlich in der Niere metabolisiert wird, können Patienten mit schwerer Niereninsuffizienz abnorm erhöhte Konzentrationen an zirkulierendem C-Peptide aufweisen.

12.7 GERICHTSMEDIZINISCHE ANWENDUNGEN

Der C-Peptide-Test eignet sich nicht für gerichtsmedizinische Untersuchungen und wurde für Proben, die nach dem Tod entnommen wurden, nicht validiert.

13 ERWARTUNGSWERTE

Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzbereiche erstellen.

Die mit unterschiedlichen Methoden erzielten Referenzbereiche können erheblich voneinander abweichen. Deshalb dürfen keine für andere Methoden festgelegten Referenzbereiche verwendet werden.

14 LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Die in diesem Abschnitt vorgelegten Daten stammen aus unabhängigen klinischen Evaluierungen und/oder von Dako.

14.1 PRÄZISION

14.1.1 Intraassay-Präzision

Drei den Testbereich umfassende, gepoolte Patientenproben wurden auf jeweils einer Platte in 24 Wiederholungen getestet.

Pool	n	MW	SA (ng/mL)	MW	SA (pmol/L)	VK (%)
1	24	1.55	0.04	513	13.3	2.6
2	24	3.6	0.12	1190	39.3	3.3
3	24	6.2	0.24	2050	80.0	3.9

14.1.2 Interassay-Präzision

Drei Pools von Patientenproben, die den Referenzbereich des Tests abdecken, wurden in 10 voneinander unabhängigen Testreihen untersucht.

Pool	n	MW	SA (ng/mL)	MW	SA (pmol/L)	VK (%)
1	10	1.77	0.08	586	26.4	4.5
2	10	3.4	0.05	1130	17.0	1.5
3	10	5.1	0.17	1690	55.8	3.3

14.1.3 Nachweisgrenze (Sensitivität)

Die Nachweisgrenze wurde in 2 voneinander unabhängigen Tests ermittelt, bei denen der Nullkalibrator in 20 Wiederholungen bestimmt wurde. Der so erzielte Mittelwert entspricht 2,5 Standardabweichungen vom mittleren Extinktionswert des Kalibrators 1.

Nachweisgrenze: 0,09 ng/mL (30 pmol/L).

14.2 GENAUIGKEIT

14.2.1 Linearität

Drei Patientenproben (Heparin-Plasma) mit hohen Analytkonzentrationen wurden mit dem Kalibrator 1 verdünnt.

Probe	Verd.-Faktor	Ergebnis (ng/mL)	Messwert/Erwartungswert (%)
1	Neat	7.6	100
	1:2	3.8	
	1:4	2.0	
2	Neat	8.0	103
	1:2	4.1	
	1:4	2.1	
3	Neat	8.1	101
	1:2	4.1	
	1:4	2.1	

14.2.2 Wiederfindung

Drei Mischungen von Serumproben mit niedrigen Analytkonzentration wurden mit verschiedenen Konzentrationen an C-Peptide versehen und die prozentuale Wiederfindung berechnet.

C-Peptide-Zusatz (ng/mL)	Ergebnis (ng/mL)	Wiederfindung (%)
Probenpool 1	2.4	
Probenpool 1 + 1.9	4.3	100
Probenpool 1 + 4.3	6.7	100
Probenpool 1 + 7.8	9.7	94
Probenpool 2	1.9	
Probenpool 2 + 1.9	3.6	90
Probenpool 2 + 4.3	5.9	93
Probenpool 2 + 7.8	9.5	97
Probenpool 3	1.5	
Probenpool 3 + 1.9	3.5	105
Probenpool 3 + 4.3	6.0	105
Probenpool 3 + 7.8	9.3	100

14.2.3 Kreuzreaktivität

Die Spezifität des Tests wurde anhand der Kreuzreaktivität mit strukturell verwandten Peptiden und Hormonen ermittelt.

Die Kreuzreaktivität (%) wurde aus dem Vergleich der jeweiligen Mengen an C-Peptide und der kreuzreagierenden Substanz, die den gleichen Extinktionswert ergaben, berechnet.

Analyse	Kreuzreaktivität (%)
Intaktes humanes Proinsulin (biosynthetisch)	84
Proinsulin-Spaltprodukt 32-33	83
Humanes Insulin	0*

* Insulin lag mit einer Konzentration von 240,000 pmol/L unterhalb der Nachweisgrenze des C-Peptide-Tests.

Die Nüchtern-Konzentrationen von intaktem Proinsulin und seinen Spaltprodukten betragen in der Regel 1-2% der C-Peptide-Konzentrationen. Eine Kreuzreaktivität mit diesen Molekülen ist daher klinisch nicht signifikant.

1. **Haibach H, Dix J & Shah J (1987).**
Homicide by insulin administration.
Journal of Forensic Sciences, **32**: 1, 208-216.
2. **Heding LG (1975).**
Radioimmunological determination of human C-peptide in serum.
Diabetologia, **11**: 541-548.
3. **Hanning I, Home PD & Alberti KGMM (1985).**
Measurement of free insulin concentrations: the influence of the timing of extraction of insulin antibodies.
Diabetologia, **28**: 831-835.

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer		Add water Ajouter de l'eau Wasser hinzufügen
	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum		Batch code Code du lot Chargenbezeichnung
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten		Use by Utiliser jusqu'à Verwendbar bis
	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Manufacturer Fabricant Hersteller
	Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Ansätze		

TECHNICAL ADVICE AND CUSTOMER SERVICE

CONSEIL TECHNIQUE ET SERVICE CLIENTELE

TECHNISCHE BERATUNG UND KUNDENDIENST

For all enquiries please contact your local Dako subsidiary or distributor.

Pour toute information, veuillez contacter votre filiale ou votre distributeur local(e) Dako.

Anfragen jeder Art richten Sie bitte an die für Sie zuständige Dako-Niederlassung oder an Ihren Händler.

Produced by/ Produit par/ Hergestellt von:

Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup
Denmark/ Danemark/ Dänemark
Tel. +45 44 85 95 00
Fax +45 44 85 95 95